



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets<sup>5</sup> :</b> <b>C12N 15/57, 9/64, G01N 33/573</b> <b>C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 91/00354</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 10 janvier 1991 (10.01.91)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR90/00513 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 5 juillet 1990 (05.07.90)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 89/09062 5 juillet 1989 (05.07.89) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> SOUBRIER, Florent [FR/FR]; 11, square Henry-Pate, F-75016 Paris (FR). ALHENC-GELAS, François [FR/FR]; 23, rue Rosenwald, F-75015 Paris (FR). HUBERT, Christine [FR/FR]; Parc Eiffel, 32, rue des Bruyères, F-92310 Sèvres (FR). CORVOL, Pierre [FR/FR]; 88, rue de Sèvres, F-75007 Paris (FR).		<b>(74) Mandataires:</b> ERNEST GUTMANN - YVES PLASSE-RAUD S.A. etc. ; 67, bd Haussmann, F-75008 Paris (FR).  <b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen)*, DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> NUCLEIC ACID CODING FOR THE HUMAN TESTICULAR ANGIOTENSIN CONVERSION ENZYME (ECA) AND ITS APPLICATIONS, IN PARTICULAR FOR THE <i>IN VITRO</i> DETECTION OF SAID ENZYME IN THE ORGANISM  <b>(54) Titre:</b> ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE (ECA) TESTICULAIRE HUMAINE, ET SES APPLICATIONS, NOTAMMENT POUR LE DEPISTAGE <i>IN VITRO</i> DE CETTE ENZYME DANS L'ORGANISME  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to the cloning and sequencing of the nucleic acid coding for human testicular ECA, and for the determination of the peptide sequence of said ECA. It is more particularly concerned with the use of nucleotide probes which can be hybridized with all or part of the above-mentioned nucleic acid, as well as with the polyclonal or monoclonal antibodies which specifically recognize all or part of the sequence above-mentioned, and with use of said probes or said antibodies for the implementation respectively of an <i>in vitro</i> method for the detection either of the RNA messenger coding for testicular ECA, or directly of testicular ECA.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention a pour objet le clonage et le séquençage de l'acide nucléique codant pour l'ECA testiculaire humaine, ainsi que la détermination de la séquence peptidique de cette ECA. Elle a plus particulièrement pour objet l'utilisation de sondes nucléotidiques susceptibles de s'hybrider avec tout ou partie de l'acide nucléique susmentionné, ou encore les anticorps polyclonaux ou monoclonaux reconnaissant spécifiquement toute ou partie de la séquence peptidique susmentionnée, et l'utilisation de ces sondes ou de ces anticorps pour la mise en œuvre respectivement d'une méthode de détection <i>in vitro</i> de l'ARN messenger codant pour l'ECA testiculaire, ou directement de l'ECA testiculaire.</p>		

### DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

#### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MC	Monaco
AU	Australie	FI	Finlande	MG	Madagascar
BB	Barbade	FR	France	ML	Mali
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	HU	Hongrie	NO	Norvège
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	LU	Luxembourg	TG	Togo
DK	Danemark			US	Etats-Unis d'Amérique

## 1

ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE (ECA) TESTICULAIRE HUMAINE, ET SES APPLICATIONS, NOTAMMENT POUR LE DEPISTAGE IN VITRO DE CETTE ENZYME DANS L'ORGANISME.

L'invention concerne un acide nucléique codant pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) dans les cellules germinales de testicules humains ainsi que des vecteurs contenant cet acide nucléique et l'utilisation de ces derniers pour la production de cette enzyme. L'invention concerne également les applications de cet acide nucléique, notamment pour le dépistage in vitro de cette enzyme dans l'organisme.

L'ECA, ou peptidyl dipeptidase A (EC 3.4.15.1), ou encore kininase II, joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle, en hydrolysant l'angiotensine I (peptide inactif libéré après clivage de l'angiotensinogène par la rénine) en angiotensine II vasopressive jouant un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle (SKEGGS, L.T., et al (1956) J. Exp. Med., 103, 295-299).

L'inhibition de l'activité de l'ECA par l'EDTA et les chélateurs de métaux, indique qu'il s'agit d'une métallopeptidase, plus particulièrement d'une peptidase à zinc, capable d'hydrolyser, non seulement, l'angiotensine I, mais aussi la bradykinine (un peptide vasodilateur et natriurétique qu'elle transforme en un heptapeptide inactif), et de nombreux autres peptides à activité biologique (YANG, H.Y.T. et al (1970) Biochim. Biophys. Acta, 214, 374-376 ; ERDOS, E.G., et al (1987) Lab. Invest., 56, 345-348).

L'ECA est une peptidase largement distribuée dans l'organisme, que l'on retrouve par exemple sous forme d'enzyme membranaire à la surface des cellules endothéliales vasculaires, et des cellules épithéliales rénales, ainsi que sous forme d'enzyme

circulant dans le plasma (ERDOS, et al (1987) sus-mentionné ; CARDWELL, P.R.B. et al, (1976) Science, 191, 1050-1051 ; RYAN, U.S. et al (1976) Tissue Cell, 8, 125-145).

Des méthodes de purification de l'ECA endothéliale humaine ou animale ont déjà été décrites (notamment dans BULL H.G. et al, (1985) J. Biol. Chem., 260, 2963-2972 ; HOOPER, N.M. et al, (1987) Biochem. J., 247, 85-93), et quelques séquences peptidiques de l'ECA endothéliale d'origine animale ont été publiées (BERNSTEIN, K.E. et al (1988), Kidney Int., 33, 652-655; HARRIS, R.B. et al (1985) J. Biol. Chem., 260, 2208-2211; IWATA, K. et al (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun, 107, 1097-1103 ; IWATA, K. et al (1983) Arch. Biochem. Biophys., 227, 188-201 ; ST CLAIR, D.K. et al (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun, 141, 968-972 ; SOFFER, RL. et al (1987) Clin. Exp. Hyp. A9, 229-234).

Quelques essais de clonage de l'ADN codant pour l'ECA animale ont été effectués à partir de deux organes riches en ECA, les reins et les poumons, mais aucun acide nucléique complet codant pour l'ECA animale n'a cependant été décrit ; seuls quelques fragments d'un tel acide nucléique ont été décrits (DELUCA-FLAHERTY, C. et al (1987) Int. J. Peptide Protein Res., 29, 678-684 ; BERNSTEIN K.E. et al, (1988), J. Biol. Chem., 263, 11021-11024). Les quantités d'ARN messager (ARNm) codant pour l'ECA sont probablement trop faibles dans ces organes pour permettre facilement le clonage d'un ADN complémentaire (ADNc) de cet ARNm.

Le clonage de l'ADN codant pour l'ECA des cellules endothéliales humaines a été réalisé pour la première fois par les auteurs de la présente demande ; la séquence nucléotidique complète de l'ADN codant

utilisés pour la détermination de l'acide nucléique codant pour l'ECA testiculaire humaine.

Une étude approfondie de l'acide nucléique de l'invention, ainsi que du polypeptide déduit à partir de ce dernier et correspondant à l'ECA testiculaire humaine, conduit aux observations suivantes :

- la séquence composite de l'ADNc de l'ACE testiculaire est de 2477 nucléotides, est délimitée par les nucléotides correspondant aux positions 1 et 2477 de la figure 1. La séquence nucléotidique, délimitée par les nucléotides situés aux positions 29 et 2224 de la figure 1, contient une phase de lecture ouverte codant pour un polypeptide de 732 acides aminés. Cette séquence nucléotidique est constituée d'une séquence d'ADN délimitée par les nucléotides correspondant aux positions 29 et 91 de la figure 1 susceptible de coder pour un peptide signal de 21 acides aminés, et d'une séquence d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux positions 92 et 2224 de la figure 1 susceptible de coder pour une protéine mature de 711 acides aminés ;
- la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 228 et 2224 de la figure 1 est identique à celle délimitée par les nucléotides situés aux positions 1944 à 3940 codant pour les 665 derniers acides aminés de l'ECA endothéliale humaine et représentée sur la figure 2 de l'article de SOUBRIER et al sus-mentionné ;
- la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 29 et 229 codant pour les 67 premiers acides aminés de la pré-enzyme testiculaire (ou précurseur de l'enzyme testiculaire), et plus particulièrement la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 92 et 229 codant pour les 46 premiers acides aminés de l'enzyme

pour l'ECA endothéliale, ainsi que la séquence en acides aminés de cette dernière sont décrits dans l'article de SOUBRIER F. et al paru dans Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, pp 9386-9390 (1988).

Une activité enzymatique du type de celle de l'ECA a également été mise en évidence dans les testicules humains et animaux (J.J. LANZILLO et al, J. Biol. Chem., 260, pp 14938-14944 (1985)).

Toutefois, la structure de l'ECA des testicules humains (ou encore désignée par l'expression ECA testiculaire) n'est pas connue à l'heure actuelle; et aucune séquence de l'ADN codant pour cette ECA testiculaire n'a été décrite jusqu'à maintenant. S.N. ROY et al affirment en 1988 dans un article de Biochem. Biophys. Res. Commun. 155 : 678-684, avoir isolé des clones mais ils ne donnent pas la séquence des clones.

La présente invention a précisément pour objet le clonage et le séquençage de l'acide nucléique codant pour l'ECA testiculaire humaine ; ce travail a été réalisé à partir de deux banques d'ADN complémentaires d'ARNm provenant de testicules humains et de sondes nucléotidiques correspondant à l'ECA endothéliale. Les techniques utilisées pour le clonage et le séquençage de l'acide nucléique selon l'invention seront plus particulièrement décrites dans la description détaillée de l'invention.

Il sera fait référence dans ce qui suit, aux figures dans lesquelles :

- la figure 1 représente l'acide nucléique ainsi que le polypeptide, déduit de ce dernier, correspondant à l'ECA testiculaire humaine ;
- la figure 2 représente les positions respectives des acides nucléiques des quatre clones

testiculaire mature, sont particulièrement spécifiques de l'ECA testiculaire ;

- le polypeptide comprenant une séquence His-Glu-Met-Gly-His correspondant aux acides aminés situés aux positions 414 à 418 de la figure 1, pourrait constituer une partie du site actif de l'ECA testiculaire.

La présente invention concerne donc tout acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend toute ou partie de la séquence nucléotidique de la figure 1, cette partie comprenant elle-même toute ou partie de la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 29 et 229 de la figure 1, et en ce qu'il code pour un polypeptide

- susceptible d'être reconnu par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux reconnaissant spécifiquement tout peptide issu de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 à 67 de la figure 1,

- et, le cas échéant, capable d'hydrolyser l'angiotensine I et/ou les kinines, notamment la bradykinine,

ou tout acide nucléique ne se distinguant du précédent au niveau de sa séquence nucléotidique que par des substitutions de nucléotides n'entraînant pas la modification de la séquence en acides aminés du susdit polypeptide dans des conditions propres à lui faire perdre les susdites propriétés.

L'invention concerne plus particulièrement tout acide nucléique comprenant la séquence d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux positions 29 et 2224 de la figure 1, et codant pour la pré-ECA testiculaire humaine (ou pro-enzyme) de 732 acides aminés ; les 21 premiers acides aminés du côté N-terminal représentent

le peptide signal, et les 711 acides aminés restant représentent l'ECA testiculaire humaine nature.

L'invention concerne également tout acide nucléique comprenant la séquence d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux positions 92 et 2224 de la figure 1, et codant pour l'ECA testiculaire humaine mature.

Parmi les acides nucléiques conformes à l'invention, on citera notamment celui comprenant une séquence d'ADN s'étendant entre, d'une part, un nucléotide situé entre les positions 1 à 92 et, d'autre part, un nucléotide situé entre les positions 229 à 2224 de la figure 1.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout acide nucléique comprenant la partie de la séquence nucléotidique de la figure 1 qui est spécifique de l'ECA testiculaire, à savoir tout acide nucléique contenant la séquence nucléotidique s'étendant entre, d'une part, le nucléotide situé à la position 29, et, d'autre part, le nucléotide situé à la position 227 de la figure 1, ou tout acide nucléique contenant une séquence issue de cette dernière.

A ce titre, l'invention concerne également :

- tout acide nucléique comprenant une séquence d'ADN d'environ 15, et de préférence 45, à 201 nucléotides, issue de la séquence nucléique s'étendant entre le nucléotide situé à la position 29 et le nucléotide situé à la position 227 de la figure 1,
- tout acide nucléique comprenant une séquence d'ADN d'environ 15, et de préférence 45, à 135 nucléotides, issue de la séquence nucléique s'étendant entre le nucléotide à la position 92 et le nucléotide situé à la position 227 de la figure 1.



L'invention concerne aussi les acides nucléiques dérivés de ceux sus-mentionnés, et dont les séquences nucléotidiques sont modifiées dans les limites autorisées par la dégénérescence du code génétique, dès lors que les polypeptides codés par ces acides nucléiques conservent soit une structure primaire identique, soit leurs propriétés immunologiques, et, le cas échéant enzymatiques.

De telles modifications non limitatives conduisent par exemple à des acides nucléiques variants qui se distinguent des acides nucléiques ci-dessus :

- par addition et/ou
- suppression d'un ou de plusieurs nucléotides et/ou
- modification d'un ou de plusieurs nucléotides.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout acide nucléique présentant la caractéristique de s'hybrider spécifiquement avec l'acide nucléique représenté sur la figure 1, notamment dans les conditions définies ci-après :

- dénaturation de l'acide nucléique (lorsqu'il est sous forme d'ADN double brin) susceptible de s'hybrider avec celui de la figure 1, avant sa fixation sur le support, défini ci-dessous, par traitement à l'aide d'une solution alcaline (0,5 M NaOH), suivie d'un passage à pH neutre.

- traitement de préhybridation du support (filtre de nitrocellulose ou membrane de nylon), sur lequel est fixé l'acide nucléique susceptible de s'hybrider avec celui de la figure 1, à 50°C pendant 3 heures avec une solution ayant la composition suivante : 25 mM  $KPO_4$ , pH 7,4 ; 5 x SSC ; 5 x Denhardt's ; 50 µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué ; 0,1 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS ou  $NaDod SO_4^-$ ),

- remplacement de la solution de pré-hybridation au contact du support par une solution tampon ayant une composition identique à celle de pré-hybridation indiquée ci-dessus, (plus éventuellement 10 % de Dextran), et comprenant l'acide nucléique de la figure 1 en tant que sonde marquée, notamment de manière radioactive, et préalablement dénaturée par un traitement à 90°C pendant 3 minutes,

- incubation pendant 12 heures à 60°C,

- lavages successifs avec les solutions suivantes :

. 2 x SSC, pendant 30 minutes à 60°C à 2 reprises,

. 1 x SSC, 0,1 % SDS pendant 1 à 2 fois 15 minutes à 65°C.

Il est à rappeler que la composition de la solution de Denhardt est la suivante : 1 % ficoll, 1 % polyvinylpyrrolidone, 1 % BSA (albumine de sérum de boeuf), et que 1 x SSC est une solution 0,15 M de NaCl et 0,015 M de citrate de sodium, pH 7.

L'invention concerne également tout acide nucléique présentant la caractéristique de s'hybrider spécifiquement avec l'acide nucléique de la figure 1 dans des conditions non stringentes reprenant les caractéristiques essentielles des conditions stringentes définies ci-dessus, sauf pour ce qui concerne la température qui est de 40°C dans les conditions non stringentes, et les lavages successifs qui, dans les conditions non stringentes, sont réalisés à l'aide de 2 x SSC avec ou sans SDS à 45°C pendant 15 minutes à 2 reprises.

L'invention a également pour objet tout acide nucléique susceptible de s'hybrider avec les acides nucléiques issus de celui de la figure 1 tels que définis ci-dessus, ou leurs séquences complémentaires,

notamment dans les conditions d'hybridation décrites ci-dessus.

L'invention vise également les sondes nucléotidiques susceptibles de s'hybrider avec la totalité de l'acide nucléique de la figure 1, ou avec tout fragment tel que défini ci-dessus de cet acide nucléique, ainsi qu'avec l'ARN messager codant pour l'ECA testiculaire et avec le gène humain responsable de l'expression de l'ECA testiculaire, notamment dans les conditions d'hybridation définies ci-dessus, ou leurs séquences complémentaires.

Il va de soi que les conditions d'hybridation stringentes ou non stringentes, définies ci-dessus constituent des conditions préférées pour l'hybridation, mais ne sont nullement limitatives et peuvent être modifiées sans affecter pour autant les propriétés de reconnaissance et d'hybridation des sondes et des acides nucléiques sus-mentionnés.

Les conditions salines et de température, au cours de l'hybridation et du lavage des membranes, peuvent être modifiées dans le sens d'une plus grande ou d'une plus faible stringence sans que la détection de l'hybridation en soit affectée. Par exemple, il est possible d'ajouter un pourcentage variable de formamide pour abaisser la température au cours de l'hybridation.

L'invention concerne également le polypeptide de la figure 1 correspondant à l'ECA testiculaire humaine, ainsi que tous les polypeptides, codés par les fragments d'ADN sus-mentionnés issus de l'acide nucléique de la figure 1, susceptibles d'être reconnus par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux reconnaissant spécifiquement tout peptide issu de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 à 67 de la figure 1, et plus

particulièrement celle délimitée par les acides aminés situés aux positions 22 à 67 de la figure 1, et, le cas échéant, de posséder une activité enzymatique du type de celle de l'ECA testiculaire

Parmi les polypeptides sus-mentionnés, on distinguera notamment :

- le polypeptide s'étendant entre les acides aminés correspondant aux positions 1 et 732 de la figure 1 ;

- le polypeptide s'étendant entre les acides aminés correspondant aux positions 22 et 732 ;

- le polypeptide dont la séquence peptidique est délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 67 de la figure 1,

- le polypeptide dont la séquence peptidique est délimitée par les acides aminés situés aux positions 22 et 67 de la figure 1,

- le polypeptide caractérisé par la séquence peptidique d'environ 5 à 67 acides aminés, issue de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 67 de la figure 1,

- le polypeptide caractérisé par la séquence peptidique d'environ 5 à 45 acides aminés, issue de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 22 et 67 de la figure 1.

Les polypeptides précédents peuvent être modifiés dès lors qu'ils conservent les propriétés biochimiques ou immunologiques ou pharmacologiques définies précédemment.

Par exemple, et de façon non limitative, des polypeptides dans le cadre de l'invention peuvent se distinguer des polypeptides définis ci-dessus ;

- par addition et/ou

- suppression d'un ou plusieurs acides aminés et/ou

- modification d'un ou de plusieurs acides aminés, sous réserve que les propriétés biochimiques ou immunologiques ou pharmacologiques comme indiqué ci-dessus soient conservées.

On conçoit que l'homme de métier dispose de la possibilité d'identifier, voire de sélectionner ceux des polypeptides de séquences plus courtes qui entrent dans le champ de l'invention. A titre de l'un des moyens généraux lui permettant de procéder à cette identification, on mentionnera, par exemple, le traitement du polypeptide de la figure 1 avec une protéase clivant le polypeptide sus-mentionné dans un site peptidique choisi, soit dans une région N-terminale, soit dans une région C-terminale, suivi de la séparation du fragment N-terminal ou du fragment C-terminal du restant dudit polypeptide, ce "restant" étant alors testé pour ses propriétés de reconnaissance par un anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre un peptide issu de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 22 à 67 de la figure 1, et, le cas échéant, pour son activité enzymatique vis-à-vis de l'angiotensine et/ou de la bradykinine. En cas de réponse positive, l'on aura alors établi que le fragment N-terminal ou C-terminal, ne jouait pas un rôle significatif, sinon essentiel pour la manifestation des propriétés immunologiques et/ou enzymatiques dudit polypeptide. L'opération peut éventuellement être répétée pour autant que l'on dispose d'une protéase susceptible de reconnaître un autre site spécifique proche d'une extrémité N-terminale ou C-terminale du polypeptide restant. La perte par le polypeptide plus petit reconnu des propriétés immunologiques et/ou enzymatiques du fragment plus long dont il était issu peut conduire à

l'hypothèse que le dernier fragment séparé jouait un rôle significatif dans la manifestation des propriétés enzymatiques du polypeptide de la figure 1.

Une autre variante, plus simple que la précédente, de détection des régions de l'ECA testiculaire essentielles à la manifestation des activités enzymatiques de cette dernière, peut être basée sur des traitements enzymatiques d'un acide nucléique codant pour l'ECA testiculaire. Ce traitement est réalisé avant l'incorporation de l'acide nucléique ainsi obtenu, et présumé coder pour un polypeptide possédant des activités immunologiques et/ou enzymatiques du type de celle de l'ECA testiculaire, dans le vecteur d'expression utilisé pour la mise en oeuvre d'un procédé de production dudit polypeptide dans l'hôte cellulaire approprié (procédé qui sera plus particulièrement détaillé dans ce qui suit). Ce traitement enzymatique peut alors consister soit en un émondage des extrémités de l'acide nucléique initial (codant par exemple pour le polypeptide de la figure 1 en entier), par exemple par une enzyme exonucléolytique, telle que Bal31, soit par une ou plusieurs enzymes de restriction choisie pour leurs sites de reconnaissance respectifs (le cas échéant aménagés par mutagenèse ponctuelle dirigée) dans la séquence de l'acide nucléique initial, soit par l'addition d'un fragment d'ADN synthétique de jonction entre le site de coupure de l'enzyme de restriction et le début de la région à exprimer. On peut ainsi supprimer à partir de l'extrémité 3' de l'ARN messager, des séquences de longueurs croissantes, remplacées par un codon stop de traduction. La même démarche peut s'appliquer à l'extrémité 5' mais nécessite de maintenir un codon d'initiation (ATG), le signal peptide ou tout autre

séquence permettant la sécrétion du peptide et de maintenir la phase ouverte de lecture.

L'acide nucléique tronqué obtenu peut alors être testé, après incorporation dans le vecteur choisi et transformation de l'hôte cellulaire avec le vecteur recombinant obtenu, pour sa capacité à exprimer un polypeptide tronqué correspondant, possédant encore les susdites propriétés immunologiques et/ou enzymatiques ou au contraire ne les possédant plus, d'où la possibilité, comme dans la variante précédente, d'identifier au sein du polypeptide de la figure 1, les séquences jouant un rôle important, sinon essentiel dans la manifestation des propriétés immunologiques et/ou enzymatiques de l'ECA testiculaire.

L'invention a également pour objet tout acide nucléique recombinant contenant tout fragment d'ADN du type sus-indiqué codant pour la pré-ECA testiculaire humaine, ou l'ECA testiculaire humaine mature, ou encore pour tout polypeptide, susceptible de posséder une activité immunologique et/ou enzymatique du type de celle de l'ECA testiculaire, associé avec un promoteur et/ou un terminateur de transcription reconnu par les polymérases de la cellule hôte dans laquelle ledit acide nucléique recombinant est susceptible d'être introduit.

L'introduction dudit acide nucléique recombinant dans la cellule hôte, est avantageusement réalisée à l'aide de vecteurs, notamment du type plasmide, qui sont aptes à se répliquer dans ladite cellule hôte et à y permettre l'expression de la séquence codant pour l'enzyme.

Ledit acide nucléique recombinant peut également être introduit dans la cellule hôte à l'aide d'un vecteur viral (virus recombinant) capable d'infecter

ladite cellule hôte, ou à l'aide d'un vecteur rétroviral capable de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte, et d'y permettre l'expression du polypeptide codé par un acide nucléique selon l'invention, ce dernier étant sous le contrôle d'un promoteur viral, ou rétroviral, actif dans la cellule hôte.

A titre d'exemples de vecteurs utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera le virus de la leucémie murine de type Moloney (ou M-MuLV) susceptible d'infecter les cellules NIH 3T3, ou le baculovirus utilisé pour infecter les cellules d'insectes.

L'invention concerne donc un procédé de production de l'ECA testiculaire humaine, ou des polypeptides sus-mentionnés issus de l'ECA testiculaire, qui comprend la transformation des cellules hôtes au moyen des vecteurs sus-indiqués, la mise en culture des cellules hôtes transformées dans un milieu approprié et la récupération desdits polypeptides soit directement à partir du milieu de culture, lorsque ces derniers y sont secrétés (notamment dans le cas où les polypeptides considérés sont précédés d'une séquence signal lors de leur synthèse dans la cellule hôte), soit après lyse de la paroi de la cellule hôte dans le cas où les polypeptides ne seraient pas secrétés hors de cette dernière.

Les cellules hôtes utilisées pour la mise en oeuvre du procédé sus-mentionné peuvent être des cellules procaryotes, notamment des cellules de E. coli, ou, d'une manière plus avantageuse, des cellules eucaryotes, qui permettent, notamment, d'obtenir des protéines sous leur forme glycosylée et mature



(levures, cellules CHO ou autres cellules, ou cellules d'insectes infectées par le baculovirus).

L'invention vise également un procédé de préparation des nouveaux polypeptides sus-mentionnés par synthèse qui comprend soit l'addition étape par étape des résidus peptidiques choisis, avec l'addition ou l'élimination de groupes protecteurs quelconques des fonctions amino et carboxyle, ou addition de résidus peptidiques choisis afin de produire des fragments, suivie d'une condensation desdits fragments en une séquence en acides aminés appropriée, avec addition ou élimination des groupes protecteurs choisis.

L'invention se rapporte également à des anticorps spécifiques dirigés contre les polypeptides ci-dessus. En particulier, l'invention vise des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre les séquences peptidiques sus-mentionnées.

Un mode d'obtention d'anticorps polyclonaux contre un peptide dérivé de la séquence de l'ECA testiculaire est brièvement résumé ci-après :

- le peptide dont la taille minimum est d'environ 5 à 15 acides aminés, est couplé

- \* soit à la sérum albumine bovine ou à la KLH (hemocyanine de Keyhole Limpets (Megathura crenulata) si le peptide contient une cystéine, qui peut être ajoutée de façon artificielle à la séquence naturelle. Cette cystéine sera auparavant activée par le SPDP = Ester N-Hydroxysuccinimide de l'acide (pyridyldithio-2)-3 propionique,

- \* soit à la KLH ou à la LPH (hemocyanine de l'hémolymphe de Limulus polyhemas) par l'intermédiaire de la benzoquinone;

- \* soit à la LPH par le glutaraldéhyde,

- \* soit à la LPH par le carbodiimide,

- le peptide couplé est ensuite injecté au lapin dans un volume égal d'adjuvant de Freund et dans le coussinet plantaire des pattes postérieures des lapins. Lors de la première injection, c'est de l'adjuvant de Freund complet qui est utilisé. Ensuite c'est de l'adjuvant incomplet,
- une injection de rappel est pratiquée toutes les 3 à 4 semaines,
- entre chaque injection, un prélèvement de sang est effectuée pour mesurer le titre des anticorps (le titre des anticorps est établi en mesurant la dilution pour laquelle le peptide qui a servi aux injections et qui est marqué radioactivement est lié à l'anticorps à 50%).

Les anticorps monoclonaux sus-mentionnés peuvent être produits par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on inocule un des polypeptides ci-dessus à un animal choisi (par exemple souris de type Biozzi ou Balb/C), dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ce polypeptide. Le protocole d'injection comprend par exemple trois injections dont la première faite avec de l'adjuvant de Freund complet. Les animaux peuvent recevoir une injection I.V. du polypeptide quelques heures avant l'isolement des cellules de la rate. Les cellules spléniques de l'animal injecté sont ensuite fusionnées avec les cellules "immortelles" de la lignée myélomateuse, selon la méthode décrite par DI PAULI (DI PAULI R, and W.C., RASCHKE, (1978), in Current topics in Microbiology and Immunology, vol. 81, F. MELCHERS, M. POTTE, and N.L. WARNER, editors, Springer-Verlag, Berlin, 37-39), à l'aide du polyéthylène glycol. Les cellules ayant fusionnées (hybridomes) sont ensuite remises en culture et

sélectionnées dans un milieu hypoxanthine-aminoptérine-thymidine. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on réalise alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment.

Les hybridomes produisant des anticorps sont ensuite clonés et sous-clonés, au mieux grâce à un trieur de cellules. Les hybridomes sont ensuite réinjectés dans le péritoine d'animaux, notamment de souris Balb/C traitées par le pristane. Les ascites sont ensuite testées pour la présence d'anticorps et les immunoglobulines présentes dans les ascites sont purifiées sur colonne d'affinité, notamment sur protéine-A Sépharose.

Des anticorps mono ou polyclonaux peuvent également être produits contre la molécule entière d'ECA.

Parmi les polypeptides utilisés pour la fabrication des anticorps polyclonaux ou monoclonaux sus-mentionnés, on mentionnera plus particulièrement les polypeptides spécifiques de l'ECA testiculaire à savoir ceux délimités par les acides aminés situés aux positions 1 et 67, ou 22 et 67 de la figure 1, ou encore ceux possédant au moins 5 acides aminés issus de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 67 de la figure 1.

L'invention concerne également une méthode de dépistage, ou de dosage, in vitro d'ECA ou produit ayant in vivo les propriétés de l'ECA, et plus particulièrement de l'ECA testiculaire humaine, ou d'un produit dérivé de l'ECA testiculaire tel que les polypeptides sus-mentionnés, dans un prélèvement biologique susceptible de les contenir. Une telle méthode de dépistage selon l'invention, peut être

réalisée soit à l'aide des anticorps monoclonaux sus-mentionnés, soit à l'aide des sondes nucléotidiques décrites ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation des anticorps polyclonaux ou monoclonaux obtenus à partir du polypeptide délimité par les acides aminés situés aux positions 1 et 67, ou celui délimité par les acides aminés situés aux positions 22 et 67, ou encore celui issu de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 67 de la figure 1, et reconnaissant spécifiquement ces polypeptides, pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage, ou de dosage, in vitro, de l'ECA testiculaire humaine.

L'invention concerne également l'utilisation des sondes nucléotidiques décrites ci-dessus, notamment celles s'hybridant avec les séquences nucléiques codant pour les polypeptides spécifiques de l'ECA testiculaire humaine décrits ci-dessus, pour la mise en oeuvre de la méthode de dépistage ou de dosage sus-mentionnée.

Le prélèvement biologique sus-mentionné est effectué soit dans des tissus fluides, tels que le sang, soit dans des organes, ce dernier type de prélèvement permettant notamment d'obtenir des coupes fines de tissus sur lesquelles les anticorps ou les sondes sus-mentionnés sont ultérieurement fixés.

La méthode de dosage selon l'invention, procédant par l'intermédiaire des anticorps sus-mentionnés comprend notamment les étapes suivantes :

- la mise en contact d'un anticorps reconnaissant spécifiquement l'ECA testiculaire ou un polypeptide dérivé de l'ECA testiculaire selon l'invention, avec le susdit prélèvement biologique dans des conditions permettant la production éventuelle d'un complexe

immunologique formé entre l'ECA testiculaire ou produit qui en est dérivé et l'anticorps sus-mentionné;

- la détection à l'aide de tout moyen approprié du susdit complexe immunologique.

Avantageusement, les anticorps utilisés pour la mise en oeuvre d'un tel procédé sont marqués notamment de manière enzymatique ou radio-active.

Une telle méthode selon l'invention peut notamment être réalisée suivant la méthode ELISA (enzyme linked sorbent assay) qui comprend les étapes suivantes :

- fixation d'une quantité prédéterminée d'anticorps sur un support solide, notamment à la surface d'un puits d'une microplaque ;

- addition du prélèvement biologique (sous forme liquide) sur ledit support ;

- incubation pendant un temps suffisant pour permettre la réaction immunologique entre lesdits anticorps et l'ECA testiculaire ou produit qui en est dérivé sus-mentionné ;

- élimination des parties non fixées du prélèvement biologique et lavage du support solide (en particulier des puits de la microplaque) ;

- addition d'une immunoglobuline marquée par une enzyme susceptible d'activer un substrat spécifique de cette enzyme,

- addition du substrat spécifique de l'activité enzymatique libérée lors de la réaction immunologique précédente ;

- détection, à l'aide de tout moyen approprié, de la dégradation du substrat par l'enzyme ; et

- corrélation de la quantité d'enzymes libérées à la concentration d'ECA humaine initialement présente dans le prélèvement biologique.

Selon un autre mode de réalisation de la méthode de dosage de l'invention, les anticorps sus-mentionnés ne sont pas marqués et la détection des complexes immunologiques formés entre les polypeptides et lesdits anticorps est réalisée à l'aide d'une immunoglobuline marquée reconnaissant lesdits complexes.

La méthode de dosage selon l'invention peut également être réalisée par une technique immuno-enzymatique suivant un mécanisme de compétition entre les polypeptides susceptibles d'être contenus dans le prélèvement biologique, et des quantités prédéterminées de ces mêmes polypeptides, vis-à-vis des anticorps sus-mentionnés. Dans ce dernier cas, les polypeptides de l'invention en quantité prédéterminée sont avantageusement marqués à l'aide d'un marqueur enzymatique.

L'invention ne se limite nullement aux modes de réalisation décrits ci-dessus pour le dosage in vitro des polypeptides de l'invention, ce dosage pouvant être réalisé à l'aide de toute autre méthode immunologique appropriée.

L'invention concerne également une méthode de dépistage, ou de dosage, in vitro d'une ECA ou produit ayant in vivo les propriétés de l'ECA, et, plus particulièrement, de l'ECA testiculaire humaine, cette méthode procédant par détection ou dosage d'un acide nucléique correspondant selon le code génétique universel à toute ou partie de cette ECA, et étant réalisée à partir d'un prélèvement biologique susceptible de contenir ledit acide nucléique. Cette méthode est caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'une sonde nucléotidique décrite ci-dessus avec le susdit prélèvement biologique dans des conditions permettant la

production éventuelle d'un complexe d'hybridation formé entre l'acide nucléique à détecter et ladite sonde ;

- la détection à l'aide de tout moyen approprié du susdit complexe d'hybridation.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le prélèvement biologique sus-mentionné est, préalablement à la mise en oeuvre du dépistage, traité de manière à ce que les cellules qu'il contient soient lysées et, éventuellement, en ce que le matériel génomique contenu dans lesdites cellules soit fragmenté à l'aide d'enzymes de restriction du type EcoRI, BamHI etc..., ou que les ARN en soient isolés, notamment selon la méthode décrite dans THOMAS, P.S. (1983) *Methods Enzymol.*, 100, 255-266.

Avantageusement, les sondes nucléotidiques de l'invention sont marquées, notamment par l'incorporation d'un (ou plusieurs) nucléotide soit radio-actif soit couplé à un haptène permettant sa détection par un anticorps, ce dernier étant conjugué à une enzyme dont l'activité est facilement détectable (par exemple la phosphatase alcaline). Les ADN, ou ARN, issus du prélèvement biologique sont placés sur un support approprié, notamment sur un filtre de nitrocellulose ou autre, par exemple membrane de nylon, sur lequel sont ensuite additionnées les sondes sus-mentionnées.

Selon un autre mode avantageux de réalisation du procédé sus-mentionné de l'invention, des coupes histologiques sont réalisées à partir du susdit prélèvement biologique et les sondes nucléotidiques de l'invention sont mises en contact direct avec des coupes histologiques pour la détection des acides nucléiques de l'invention par hybridation in situ.

L'invention concerne également l'application de la méthode de dépistage ou de dosage de l'ECA

testiculaire sus-mentionnée aux diagnostic in vitro de pathologies spécifiques des testicules (en particulier au niveau des cellules germinales), notamment de tumeurs de testicules (encore appelés séminomes), de la maturation des cellules germinales mâles, des hypofertilités et stérilités masculines.

Dans le cadre de diagnostic de l'hypofertilité et de la stérilité masculine, la méthode sus-mentionnée est avantageusement réalisée à partir du sperme, ou de cellules germinales ou du plasma séminal isolés à partir du sperme, ou à partir de biopsie testiculaire.

L'invention a également pour objet des nécessaires ou kits pour la mise en oeuvre des méthodes de dépistage, ou de dosage, in vitro sus-mentionnés.

A titre d'exemple, de tels kits comprennent notamment:

- une quantité déterminée d'un des anticorps polyclonaux ou monoclonaux sus-mentionnés susceptible de donner lieu à une réaction immunologique spécifique avec l'ECA testiculaire ou avec un des polypeptides dérivés de l'ECA testiculaire selon l'invention ;

- et/ou une quantité déterminée d'ECA testiculaire ou un polypeptide susceptible de donner lieu à une réaction immunologique avec les anticorps sus-mentionnés ;

- avantageusement, un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre l'ECA ou les polypeptides de l'invention et les anticorps sus-mentionnés ;

- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques produits lors de la réaction immunologique sus-mentionnée.

Dans le cadre de la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro utilisant des sondes



nucléotidiques, les kits utilisés comprennent par exemple :

- une quantité déterminée d'une des sondes nucléotidiques sus-mentionnées susceptible de donner lieu à une réaction d'hybridation avec un des acides nucléiques sus-mentionnés codant pour l'ECA testiculaire ou un polypeptide dérivé de l'ECA testiculaire selon l'invention ;

- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation produits lors de la réaction d'hybridation sus-mentionnée.

L'invention concerne également l'utilisation du polypeptide de la figure 1 ou de tout fragment peptidique approprié issu de ce dernier, pour la conception de nouveaux inhibiteurs de l'ECA humaine, plus puissants et/ou spécifiques de cette dernière que ne le sont les actuels inhibiteurs de l'ECA.

L'invention a également pour objet une méthode de détection ou de dosage, d'un inhibiteur de l'ECA, ou de quantification de son pouvoir inhibiteur, qui comprend la mise en contact du polypeptide de la figure 1, ou de tout fragment peptidique issu de ce dernier et possédant une activité enzymatique du type de celle de l'ECA, avec ledit inhibiteur, et la détermination, pour ces inhibiteurs de la constante de dissociation  $[K_i]$  et de la concentration nécessaire à une inhibition de 50%  $[IC_{50}]$  de l'enzyme.

L'invention concerne également l'utilisation du polypeptide de la figure 1, ou de tout fragment de ce dernier, tel que décrit ci-dessus, capable d'hydrolyser les kinines, notamment la bradykinine, dans le traitement des maladies inflammatoires, ou infectieuses, de la pancréatite aigue, et plus généralement de maladies où une libération de kinines dans l'organisme pourrait jouer un rôle pathogène.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement des compositions pharmaceutiques pour le traitement des maladies indiquées ci-dessus, caractérisée par l'association de tout ou partie du polypeptide de la figure 1, capable d'hydrolyser les kinines, notamment la bradykinine, avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des sondes nucléotidiques de l'invention, capables de s'hybrider avec le gène responsable de l'expression de l'ECA testiculaire humaine dans les conditions décrites ci-dessus, pour la détermination des différentes formes alléliques du gène sus-mentionné.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique d'environ 15 à environ 30 nucléotides issue de la séquence nucléotidique de la figure 1, ou une séquence complémentaire de cette dernière, ou encore une séquence d'environ 15 à 30 nucléotides susceptible de s'hybrider (dans les conditions décrites ci-dessus) avec ladite séquence d'environ 15 à 30 nucléotides issue de la figure 1, et l'utilisation de telles séquences en tant qu'amorces permettant l'amplification génique de toute ou partie de la séquence nucléotidique de la figure 1, notamment selon la méthode d'amplification décrite dans la demande de brevet européen n° 86/302.298.4 du 27/03/1986.

Ces amorces oligonucléotidiques sont particulièrement utiles dans le cadre de la synthèse de l'ECA testiculaire par voie du génie génétique telle que décrite ci-dessus, dont les différentes étapes sus-mentionnées sont précédées par une étape d'amplification du gène codant pour l'ECA testiculaire

préalablement à l'étape de transformation des cellules hôtes.

L'invention concerne également une méthode de détection in vitro de l'ARNm codant pour l'ECA testiculaire, telle que décrite ci-dessus, comprenant une étape préalable d'amplification de toute ou partie de cet ARNm (ou l'amplification de la copie d'ADN de l'ARN codant pour l'ECA testiculaire), le cas échéant, isolé des autres constituants cellulaires, à l'aide d'un ou de plusieurs, couple d'amorces telles que définies ci-dessus.

A ce titre, l'invention a également pour objet des kits de diagnostic tels que décrits ci-dessus, et contenant également au moins un couple d'amorces susmentionnées, ces amorces étant susceptibles d'amplifier le nombre de copies de l'acide nucléique à détecter en présence d'une polymérase appropriée et des quantités appropriées des 4 désoxynucléotides triphosphate différents, dATP, dGTP, dCTP et dTTP.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit du clonage de l'acide nucléique codant pour l'ECA testiculaire humaine, ainsi que des sondes utilisées pour ce clonage, étant entendu que cette description ne saurait être interprétée comme tendant à restreindre la portée des revendications.

#### **I - SEQUENCAGE DE L'ADN COMPLEMENTAIRE DE L'ECA TESTICULAIRE HUMAINE**

Une banque d'ADNc de testicules humains amorcée avec de l'oligo(dT), construite dans le phage  $\lambda$ gt11 (clontech laboratories Inc.) a été criblée en utilisant la sonde décrite ci-dessous.

Les hybridations avec les phages ont été effectuées selon la méthode de Benton WD et Davis RW Science (WASHINGTON) 1977, 196, 180-182. Plus

précisément les hybridations ont été effectuées dans une solution constituée de 6XSSC (1XSSC correspond à NaCl 150 mM, citrate de sodium 15 mM), 0,1 % de NaDodSO<sub>4</sub>, tampon NaPO<sub>4</sub> 50 mM à pH 6,8, 0,1 mg/ml d'ADN dénaturé, de sperme de saumon à 65°C.

La séquence utilisée comme sonde est contenue dans le bactériophage  $\lambda$ 19-22 et représente les 3248 derniers nucléotides de la séquence d'ADN complémentaire (position 691 à 4024), telle que décrite dans l'article de SOUBRIER F. et al, sus-mentionné. Elle a été choisie car elle hybride avec l'ARN messager de l'ECA dans le testicule humain. La séquence clonée de l'ADN de l'ECA endothéliale a été utilisée comme sonde, par marquage statistique à l'aide de la DNA polymérase I de E.coli et d'amorces oligonucléotidiques, selon la méthode décrite par FEINBERG AP et al (1983) Anal. Biochem., 132, 6-13. En utilisant l'alpha [<sup>32</sup>P], deoxycytidine triphosphate, d'activité spécifique 3000ci/mmole, la sonde a une activité spécifique de 2 à 8 x 10<sup>9</sup> cpm/μg d'ADN. La concentration de la sonde radioactive dans la solution d'hybridation des filtres est de 10<sup>6</sup> cpm/ml. Les filtres ont ensuite été lavés en condition de forte stringence (lavage final en 0,1 x SSC, 0,1 % NaDodSO<sub>4</sub>) à 68°C pendant 30 minutes. Le criblage de 2 x 10<sup>6</sup> clones de la banque a permis d'isoler 17 clones positifs. Parmi ceux-ci, deux clones positifs ont été isolés. Les fragments d'ADN insérés dans les phages recombinants ont été purifiés et insérés dans le site EcoRI du plasmide pBluescript (Sratagene). La séquence des insertions a été obtenue soit directement sur l'ADN double brin des plasmides, soit en obtenant de l'ADN simple brin en infectant les cultures à l'aide du phage helper KO7.

La détermination de la séquence nucléotidique de ces clones a été effectuée par la méthode de Sanger (SANGER, F. et al (1977), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467) en utilisant soit l'ADN polymérase de klenow, soit l'ADN polymérase de T7 modifiée (Sequenase, US Biochemical). Quelques régions ont été séquencées en utilisant à la place de la déoxyguanosine tri-phosphate (dGTP), le déoxyinosine tri-phosphate (dITP) ou le deaza-déoxyguanosine tri-phosphate (7-deaza dGTP). L'électrophorèse des fragments marqués par le  $[S^{35}]$  dATP a été pratiquée sur gel d'urée-polyacrylamide. Les séquences ont été déterminées en synthétisant des oligomères de proche en proche toutes les 350 paires de base environ qui ont servi d'amorces échelonnées le long de la séquence.

Le clone  $\lambda$ ht10 contient une séquence d'une longueur de 2217 nucléotides et qui s'étend de la position 260 à 2477 de la séquence du cDNA testiculaire portée sur la figure 1. Ce clone s'étend dans la région 3' de l'ARN messenger jusqu'à la séquence de polyadénylation et comprend une courte séquence poly(A). Le clone  $\lambda$ ht16, d'une longueur de 2263 nucléotides, correspond à la région du cDNA testiculaire située entre la position 50 et 2313 de la figure 1. Un oligomère d'une longueur de 22 nucléotides, a été synthétisé et utilisé pour cribler à nouveau la banque afin d'obtenir des clones correspondant à la région la plus 5' de l'ARN messenger. La séquence de cet oligomère est contenue dans la séquence du clone  $\lambda$ ht16 (position 59 à 80). L'oligomère a été marqué au N  $\gamma$ - $[^{32}P]$  adénosine triphosphate ATP (activité spécifique 5000 cpm/pmol) à l'aide de la T4 polynucléotide kinase. L'activité spécifique de la sonde est de  $5 \times 10^6$  cpm/pmol. Les

filtres ont été criblés dans les mêmes conditions que précisées au dessus à part les modification suivantes : la température d'hybridation était de 60°C et la température de lavage de 65°C dans une solution 2 X SSC. Ce criblage a permis d'isoler le clone  $\lambda$ ht341, d'une longueur de 2,2 kb, qui s'étend en 5' jusqu'au nucléotide 31 du cDNA testiculaire de l'ACE.

De manière à obtenir l'ADN complémentaire correspondant à l'extrémité 5' de l'ARN messenger codant pour l'ECA testiculaire, une autre banque de donnée d'ADNc a été construite en utilisant 5  $\mu$ g d'ARN isolé à partir de tissu testiculaire humain obtenu lors d'une intervention chirurgicale. La banque d'ADN complémentaire a été construite selon la méthode de Gübler et Hoffman (Gene (1983), 25, 263-269), en utilisant deux amorces. D'une part une amorce spécifique de l'ARN messenger de l'ECA, déterminé par la séquence des clones précédemment obtenus. Il s'agit d'un oligomère de 17 bases (ATH17), complémentaire d'une séquence localisée en position 228-244 de la figure 1. La seconde amorce correspond à l'oligo-d(T)12-18 mers (pharmacia). Les ADN complémentaires double-brin ont été synthétisés puis insérés dans le phage  $\lambda$ gt10 coupé par l'enzyme EcoRI selon la méthode de Koenig et al (Koenig, M et al, (1987) Cell, 50, 509-517).

Les phages recombinants ( $1 \times 10^6$  phages recombinants) ont été criblés à l'aide de l'oligomère TH16, marqué comme précédemment. Les conditions de criblage de la banque sont identiques à celles décrites plus haut avec la même sonde. Parmi les clones positifs obtenus, le clone  $\lambda$ ht221, d'une longueur de 244 paires de base a été séquencé. Il contient la partie la plus 5' de l'ARN messenger codant pour l'ECA testiculaire.

La séquence de l'ARN messenger testiculaire, telle qu'elle peut être déduite de la séquence nucléotidique composite du cDNA testiculaire obtenue à partir des 4 clones, est longue de 2477 nucléotides. Elle présente une séquence nucléotidique identique à celle de l'ARN messenger endothélial, en 3' de la position 228 du cDNA testiculaire. En 5' de cette position les deux ARN messagers testiculaires et endothéliaux divergent et la séquence spécifique testiculaire déterminée est de 228 nucléotides. Depuis le premier codon ATG jusqu'au codon stop, il existe une phase ouverte codant pour 732 acides aminés. L'analyse de la séquence peptidique déduite de la séquence nucléotidique montre qu'il existe après la méthionine de départ de la traduction, un peptide qui présente les caractéristiques d'un signal peptide et en utilisant le programme décrit par VON HEIJNE (Nucleic Acids Research, (1986), 14, 4683-4690) pour la prédiction des sites de coupure d'un signal peptide, le site de coupure du signal peptide se situerait entre l'acide aminé en position 21 et celui en position 22. A la suite de cette séquence signal, la séquence peptidique spécifique de l'ECA testiculaire est très riche en serine et en thréonine, sites potentiels de glycosylation, et ce type de séquence est évocateur de O-glycosylation groupée.

Les caractéristiques enzymatiques de l'enzyme testiculaire étant identiques à celle de l'enzyme endothéliale, notamment en ce qui concerne le  $K_m$ , la  $V_{max}$ , et  $K_{cat}$  sur l'angiotensine I, la comparaison de sa structure avec celle de l'enzyme endothéliale apporte des informations intéressantes concernant les relations structure activité dans la molécule d'ECA. En effet, l'enzyme endothéliale est constituée de deux grands domaines, très homologues entre eux. Chacun de

ces domaines contient une courte séquence d'acides aminés consensus du site actif des métallopeptidases à zinc tels que la thermolysine, la collagénase ou l'endopeptidase neutre. L'enzyme de conversion testiculaire ne contient que le domaine carboxyterminal de l'ECA, endothéliale, ce qui semble indiquer que ce domaine à lui seul porte les structures responsables de l'activité enzymatique. Une autre hypothèse serait que l'enzyme testiculaire agit sous forme d'un dimère, cependant l'enzyme testiculaire native de lapin testée en condition non dénaturante par centrifugation en gradient de densité a bien un poids moléculaire inférieur à celui de l'ECA endothéliale.



## REVENDEICATIONS

1. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléique de la figure 1, ou une partie de cette séquence, cette partie comprenant elle-même toute ou partie de la séquence nucléique délimitée par les nucléotides situés aux positions 29 et 229 de la figure 1, et en ce qu'il code pour un polypeptide, ce polypeptide étant :

- susceptible d'être reconnu par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux reconnaissant spécifiquement tout peptide issu de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 à 67 de la figure 1,

- et, le cas échéant, capable d'hydrolyser l'angiotensine I et/ou les kinines, notamment la bradykinine,

ou tout acide nucléique ne se distinguant du précédent au niveau de sa séquence nucléotidique que par des substitutions de nucléotides n'entraînant pas la modification de la séquence en acides aminés du susdit polypeptide dans des conditions propres à lui faire perdre les susdites propriétés.

2. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il est susceptible de s'hybrider avec l'acide nucléique représenté sur la figure 1, dans les conditions d'hybridation stringentes suivantes :

- dénaturation de l'acide nucléique (ADN) susceptible de s'hybrider avec celui de la figure 1, par traitement à l'aide d'une solution alcaline (0,5 M NaOH), suivie d'un passage à pH neutre,

- traitement de préhybridation du support (filtre de nitrocellulose ou membrane de nylon), sur lequel est fixé l'acide nucléique représenté sur la figure 1, à 50°C pendant 3 heures avec une solution ayant la composition suivante : 25 mM  $KPO_4$ , pH 7,4 ; 5 x SSC ;

5 x Denhardt's ; 50 µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué ; 0,1 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS ou NaDod SO<sub>4</sub><sup>-</sup>),

- remplacement de la solution de pré-hybridation au contact du support par une solution tampon ayant une composition identique à celle de pré-hybridation indiquée ci-dessus, (plus éventuellement 10 % de Dextran), et comprenant l'acide nucléique de la figure 1 en tant que sonde marquée, notamment de manière radioactive, et préalablement dénaturée par un traitement à 90°C pendant 3 minutes,

- incubation pendant 12 heures à 60°C,

- lavages successifs avec les solutions suivantes :

- . 2 x SSC, pendant 30 minutes à 60°C à 2 reprises,

- . 1 x SSC, 0,1 % SDS pendant 1 à 2 fois 15 minutes à 65°C.

3. Acide nucléique caractérisé en ce que qu'il est susceptible de s'hybrider avec l'acide nucléique de la figure 1 dans des conditions non stringentes reprenant les caractéristiques essentielles des conditions stringentes définies dans la revendication 2, sauf pour ce qui concerne la température qui est de 40°C dans les conditions non stringentes, et les lavages successifs qui, dans les conditions non stringentes, sont réalisés à l'aide de 2 x SSC avec ou sans SDS à 45°C pendant 15 minutes à 2 reprises.

4. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux positions 92 et 2224 de la figure 1, codant pour l'ECA testiculaire humaine mature.

5. Acide nucléique selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite séquence d'ADN codant pour l'ECA testiculaire humaine mature est précédée

par une séquence d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux positions 29 et 91 de la figure 1, cette dernière codant pour un peptide signal de 21 acides aminés.

6. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN s'étendant entre, d'une part, le nucléotide situé entre les positions 1 à 92 et, d'autre part, le nucléotide situé entre les positions 229 à 2224 de la figure 1.

7. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN d'environ 15 à 201 nucléotides, issue de la séquence nucléique s'étendant entre le nucléotide situé à la position 29 et le nucléotide situé à la position 229 de la figure 1.

8. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN d'environ 15 à 135 nucléotides, issue de la séquence nucléique s'étendant entre le nucléotide situé à la position 92 et le nucléotide situé à la position 229 de la figure 1.

9. Polypeptide codé par l'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend toute ou partie de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 à 732 de la figure 1, et en ce qu'il est

- susceptible d'être reconnu par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux reconnaissant spécifiquement tout peptide issu de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 à 67 de la figure 1,

- et, le cas échéant, capable d'hydrolyser l'angiotensine I et/ou les kinines, notamment la bradykinine.

10. Polypeptide selon la revendication 9, caractérisé par la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 22 et 732 de la figure 1.

11. Polypeptide selon la revendication 9, caractérisé par la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 67 de la figure 1

12. Polypeptide selon la revendication 6, caractérisé par la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 22 et 67 de la figure 1.

13. Polypeptide selon la revendication 9, caractérisé par la séquence peptidique d'environ 5 à 67 acides aminés, issue de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 67 de la figure 1,

14. Polypeptide selon la revendication 9, caractérisé par la séquence peptidique d'environ 5 à 45 acides aminés, issue de la séquence peptidique délimitée par les acides aminés situés aux positions 22 et 67 de la figure 1.

15. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 associée avec un promoteur sous le contrôle duquel la transcription de ladite séquence est susceptible d'être effectuée et, le cas échéant, une séquence d'ADN codant pour des signaux de terminaison de la transcription.

16. Vecteur recombinant, notamment plasmide recombinant, ou virus recombinant, capable de transformer, ou d'infecter, une cellule hôte appropriée, notamment une cellule eucaryote, ledit vecteur contenant un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 sous le contrôle

d'éléments de régulation permettant l'expression de ce fragment d'ADN dans la cellule hôte, notamment d'un promoteur reconnu par les polymérases de ladite cellule hôte.

17. Procédé de production de l'ECA testiculaire humaine, mature ou non, ou d'un polypeptide issu de l'ECA testiculaire humaine selon l'une quelconque des revendications 9 à 15, ce procédé comprenant la transformation de cellules hôtes au moyen du vecteur selon la revendication 16, la mise en culture des cellules hôtes transformées dans un milieu de culture approprié et la récupération de l'enzyme à partir de ces cellules ou du milieu de culture.

18. Anticorps polyclonal ou monoclonal, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 9 à 15.

19. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence nucléotidique susceptible de s'hybrider avec toute ou partie de l'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans les conditions définies dans la revendication 2 ou la revendication 3, ou toute sonde nucléotidique ne se distinguant de la précédente au niveau de sa séquence nucléotidique que par des substitutions de nucléotides n'entraînant pas la modification des propriétés d'hybridation de ladite sonde avec l'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

20. Amorce nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est constituée d'une succession d'environ 15 à 30 nucléotides issue d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 8, ou d'une séquence complémentaire de cette dernière, ou en ce qu'elle est constituée d'une succession d'environ 15 à

30 nucléotides susceptible de s'hybrider avec l'une de ces séquences.

21. Méthode de dépistage, ou de dosage, in vitro d'une ECA ou produit ayant in vivo les propriétés de l'ECA, et, plus particulièrement, de l'ECA testiculaire humaine, dans un prélèvement biologique susceptible de la contenir, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'un anticorps selon la revendication 18, avec le susdit prélèvement biologique dans des conditions permettant la production éventuelle d'un complexe immunologique formé entre l'ECA ou produit qui en est dérivé et l'anticorps sus-mentionné ;

- la détection du susdit complexe immunologique.

22. Méthode de dépistage, ou de dosage, in vitro d'une ECA ou produit ayant in vivo les propriétés de l'ECA, et, plus particulièrement, de l'ECA testiculaire humaine dans un prélèvement biologique susceptible de la contenir, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- le cas échéant, l'amplification du nombre de copies de l'acide nucléique à détecter à l'aide d'un couple d'amorces selon la revendication 20,

- la mise en contact d'une sonde nucléotidique selon la revendication 19, avec le susdit prélèvement biologique dans des conditions permettant la production éventuelle d'un complexe d'hybridation formé entre la sonde et l'acide nucléique à détecter,

- la détection du susdit complexe d'hybridation.

23. Méthode de dépistage in vitro selon la revendication 21 ou 22, appliquée au diagnostic in vitro de la maturation des cellules germinales mâles humaines, des hypofertilités, et des stérilités

masculines, ou encore des tumeurs testiculaires (ou séminomes).

24. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro selon les revendications 21 et 23 comprenant :

- une quantité déterminée d'un anticorps selon la revendication 18 susceptible de donner lieu à une réaction immunologique avec un polypeptide à détecter selon l'une quelconque des revendications 9 à 15 ;

- avantageusement, un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre le polypeptide et l'anticorps sus-mentionnés ;

- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre le polypeptide et l'anticorps lors de la susdite réaction immunologique.

25. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro selon les revendications 22 et 23 comprenant :

- le cas échéant, au moins un couple d'amorces selon la revendication 20,

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon la revendication 19, susceptible de donner lieu à une réaction d'hybridation avec un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 ;

- avantageusement, un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre l'acide nucléique et la sonde sus-mentionnée ;

- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre l'acide nucléique et la sonde lors de la susdite réaction d'hybridation.

26. Compositions pour le traitement de maladies inflammatoires ou infectieuses, notamment de la

38

pancréatite aigue, et des maladies où les kinines jouent un rôle pathogène, caractérisées par l'association d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 9 à 15, avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.



AGTCGAGGACTCTGCTCTCTCTGCGGCCATGGGCCAGGGTTGGGCTACTGCAGGACTTCCCAGCCTC  
MetGlyGlnGlyTyrAlaThrAlaGlyLeuProSerLeu  
10  
CTCTTCCTGCTGCTGTCTACGGGCACCCCTCTGCTGGTCCCTAGCCAGGAGGCATCCCAACAGGTG 133  
LeuPheLeuLeuCysTyrGlyHisProLeuLeuValProSerGlnGluAlaSerGlnGlnVal  
20 30  
ACAGTCACCCCATGGGACAAGCAGCCAGGCCAACAACCCAGCAGCCAGACAACACCCACCCAGCGACGGCC  
ThrValThrHisGlyThrSerSerGlnAlaThrThrSerSerGlnThrThrThrHisGlnAlaThrAla  
40 50  
CACCAGACATCAGCCCCAGAGCCCCAACCTGGTGACTGATGAGGCTGAGGCCAGCAAGTTTGTGGAG 268  
HisGlnThrSerAlaGlnSerProAsnLeuValThrAspGluAlaGluAlaSerLysPheValGlu  
60 70 80  
GAATATGACCGGACATCCAGGTGGTGTGGAACGAGTATGCCGAGGCCAACTGGAACTACAACACCAAC  
GluTyrAspArgThrSerGlnValValTyrAsnGluTyrAlaGluAlaAsnTyrAsnTyrAsnThrAsn  
90 100  
ATCACACAGAGACCAGCAAGATTCTGCTGCAGAGAACAATGCAATAGCCAAACCCACACCCCTGAAG 403  
IleThrThrGluThrSerLysIleLeuLeuGlnLysAsnMetGlnIleAlaAsnHisThrLeuLys  
110 120  
TACGGCACCCAGGCCAGGAAGTTTGATGTGAACCAGTTGCAGAACACCACTATCAAGCGGATCATAAAG  
TyrGlyThrGlnAlaArgLysPheAspValAsnGlnLeuGlnAsnThrThrIleLysArgIleIleLys  
130 140  
AAGGTTCAGGACCTAGAACGGGCAGCGCTGCCCTGCCCAGGAGCTGGAGGAGTACAACAAGATCCTG 538  
LysValGlnAspLeuGluArgAlaAlaLeuProAlaGlnGluLeuGluGluTyrAsnLysIleLeu  
150 160 170  
TTGGATATGGAAACCACTACAGCGTGGCCACTGTGTGCCACCCGAAATGGCAGCTGCCTGCAGCTCGAG  
LeuAspMetGluThrThrTyrSerValAlaThrValCysHisProAsnGlySerCysLeuGlnLeuGlu  
180 190

1 / 6

Figure 1

2/6

CCAGATCTGACGAATGTGATGGCCACATCCCGGAAATATGAAGACCTGTTATGGCATGGAGGGC 673  
 ProAspLeuThrAsnValMetAlaThrSerArgLysTyrGluAspLeuLeuTrpAlaTrpGluGly 200 210  
 TGGCGAGACAAGCGGGGAGAGCCATCCTCCAGTTTACCCGAAATACGTGGAACATCATCAACCAAGGCT 210  
 TrpArgAspLysAlaGlyArgAlaIleLeuGlnPheTyrProLysTyrValGluLeuIleAsnGlnAla 220 230  
 GCCCGGCTCAATGGCTATGTAGATGCAGGGGACTCGTGGAGGTCTATGTACGAGACACCATCCCTG 808  
 AlaArgLeuAsnGlyTyrValAspAlaGlyAspSerTrpArgSerMetTyrGluThrProSerLeu 240 250 260  
 GAGCAAGACCTGGAGCGGCTCTTCCAGGAGCTGCAGCCACTCTACCTCAACCTGCATGCTACGTGCGC  
 GluGlnAspLeuGluArgLeuPheGlnGluLeuGlnProLeuTyrLeuAsnLeuHisAlaTyrValArg 270 280  
 CGGGCCCTGCACCGTCACTACGGGGCCAGCACATCAACCTGGAGGGGCCCATTCCTGCTCACCTG 943  
 ArgAlaLeuHisArgHisTyrGlyAlaGlnHisIleAsnLeuGluGlyProIleProAlaHisLeu 290 300  
 CTGGGGAACATGTGGCGCAGACCTGGTCCAACATCTATGACTTGGTGGTGGCCCTTCCCTTCAGCCCCC  
 LeuGlyAsnMetTrpAlaGlnThrTrpSerAsnIleTyrAspLeuValValProPheProSerAlaPro 310 320  
 TCGATGGACACACAGAGGCTATGCTAAAGCAGGGGTGGACGGCCCGAGGAGGATGTTAAGGAGGCT 1078  
 SerMetAspThrThrGluAlaMetLeuLysGlnGlyTrpThrProArgArgMetPheLysGluAla 330 340 350  
 GATGATTTCTTCACCTCCCTGGGGCTGCTGCCCGTGCCTCCTGAGTTCTGTGGAACAAGTCGATGCTGGAG  
 AspAspPhePheThrSerLeuGlyLeuLeuProValProProGluPheTrpAsnLysSerMetLeuGlu 360 370

Figure 1 (suite)

3/6

AAGCCAACCGGCGGAGGTGGTCTGCCACGCCCTGGCCTGGGACTTCTACAACGGCAAGGAC 1213  
 LysProThrAspGlyArgGluValValCysHisAlaSerAlaTrpAspPheTyrAsnGlyLysAsp 390  
 380  
 TTCCGGATCAAGCAGTGCACCAACCGTGAACCTTGGAGGACCTGGTGGTGGCCCAACGAAATGGGCCAC  
 PheArgIleLysGlnCysThrThrValAsnLeuGluAspLeuValValAlaHisHisGluMetGlyHis 410  
 400  
 ATCCAGTATTTTCATGCAGTACAAAGACTTACCTGTGGCCTTGAGGGAGGGTGCCAAACCCGGCTTC 1348  
 IleGlnTyrPheMetGlnTyrLysAspLeuProValAlaLeuArgGluGlyAlaAsnProGlyPhe 440  
 430  
 CATGAGGCCATTGGGGACGTGCTAGCCCTCTCAGTGTCTACGCCCAAGCACCTGCACAGTCTCAACCTG  
 HisGluAlaIleGlyAspValLeuAlaLeuSerValSerThrProLysHisLeuHisSerLeuAsnLeu 460  
 450  
 CTGAGCAGTGAGGGTGGCAGCGAGCATGACATCAACTTTCTGATGAAGATGGCCCTTGACAAG 1483  
 LeuSerSerGluGlyGlySerAspGluHisAspIleAsnPheLeuMetLysMetAlaLeuAspLys 480  
 470  
 ATCGCCTTTATCCCCTTCAGCTACCTCGTCGATCAGTGGCGCTGGAGGGTATTTGATGGAAGCATCACCC  
 IleAlaPheIleProPheSerTyrLeuValAspGlnTrpArgTrpArgValPheAspGlySerIleThr 500  
 490  
 AAGGAGAACTATAACCAAGGAGTGGTGGAGCCCTCAGGCTGAAGTACCAGGGCCTCTGCCCCCAGTG 1618  
 LysGluAsnTyrAsnGlnGluTrpTrpSerLeuArgLeuLysTyrGlnGlyLeuCysProProVal 530  
 510  
 CCCAGGACTCAAGGTGACTTTGACCCAGGGCCAAAGTTCCACATTCTCTAGCGTGCCTTACATCAGG  
 ProArgThrGlnGlyAspPheAspProGlyAlaLysPheHisIleProSerSerValProTyrIleArg 550  
 540

Figure 1 (suite)

4/6

TACTTTGTCAGCTTCATCATCCAGTTCCAGTTCACGAGGCACCTGTGCCAGGCAGCTGGCCACACG 1753  
 TyrPheValSerPheIleIleGlnPheGlnPheHisGluAlaLeuCysGlnAlaAlaGlyHisThr  
 570  
 GGCCCCCTGCACAAGTGTGACATCTACCAGTCCAAGAGGCCGGCAGCGCCCTGGCGACCGCCATGAAG  
 GlyProLeuHisLysCysAspIleTyrGlnSerLysGluAlaGlyGlnArgLeuAlaThrAlaMetLys  
 590  
 CTGGGCTTCAGTAGGCCGTGGCCGGAAGCCATGCAGCTGATCAGGGGCCAGCCCCAACATGAGCGCC 1888  
 LeuGlyPheSerArgProTrpProGluAlaMetGlnLeuIleThrGlyGlnProAsnMetSerAla  
 620  
 TCGGCCATGTTGAGCTACTTCAAGCCGCTGCTGGACTGGCTCCGCACGGAGAACGAGCTGCATGGGGAG  
 SerAlaMetLeuSerTyrPheLysProLeuLeuAspTrpLeuArgThrGluAsnGluLeuHisGlyGlu  
 640  
 AAGCTGGGCTGGCGCAGTACAACCTGGACGCCGAACCTCCGCTCGCTCAGAGGGCCCTCCACAGAC 2023  
 LysLeuGlyTrpProGlnTyrAsnTrpThrProAsnSerAlaArgSerGluGlyProLeuProAsp  
 660  
 AGCGGCGCGTCAGCTTCCTGGGCTGGACCTGGATGCGCAGCAGGCCCGCGTGGGCCAGTGGCTGCTG  
 SerGlyArgValSerPheLeuGlyLeuAspLeuAspAlaGlnGlnAlaArgValGlyGlnTrpLeuLeu  
 680  
 CTCTTCTGGGCATCGCCCTGCTGGTAGCCACCCCTGGGCTCAGCCAGCGGCTCTTCAGCATCCGC 2158  
 LeuPheLeuGlyIleAlaLeuLeuValAlaThrLeuGlyLeuSerGlnArgLeuPheSerIleArg  
 710  
 CACCGCAGCCTCCACGGCCTCCCGGCGGCCCCAGTTCCGGCTCCGAGGTGGAGCTGAGACACTCCTGA  
 HisArgSerLeuHisArgHisSerHisGlyProGlnPheGlySerGluValGluLeuArgHisSer \*  
 730

Figure 1 (suite)

GGTGACCCGGCTGGGTGGCCCTGCCCAAGGGCCCTCCACCCAGAGACTGGGATGGGAACACTGGTG 2293  
GGCAGCTGAGGACACACCCCCACACCCAGCCACCCCTGCTCTCTCTGCCCCCTGCTCCCTGCTCCCCCTCCCC  
TCCCAGTCTCCACCAACCAAGCCCGCCCGCCCTTCTCCAGCACAGGCTGCCTGACACTGAGCC 2428  
CCACCTCTCCAAGTCTCCCTGTGAATACAATTAAAGGTCCTGCCCTCCC (A) 2477

Figure 1 (suite)

6/6

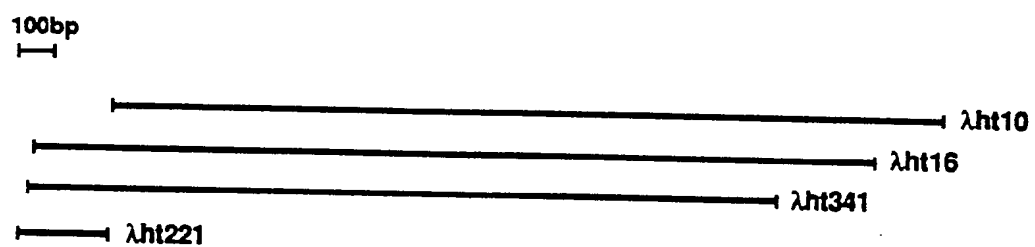


Figure 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR90/00513

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC <sup>5</sup> : C12N 15/57; C12N 9/64; G01N 33/573; C12Q 1/68		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC <sup>5</sup>	C12N; G01N; C12Q; C07K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> *		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. Volume 85, No. 24, December 1988, WASHINGTON US pages 9386 - 9390; SOUBRIER, F. et al.: "Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning." see the whole document	2-3, 15-16
Y	(cited in the application)	1, 4-6, 9-12, 18
X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. Volume 128, No. 1, 16 April 1985, DULUTH, MINNESOTA US pages 457 - 463; LANZILLO, J.J. et al.: "Human testicular angiotensin-converting enzyme is a mixture of two molecular weight forms. Only one is similar to the seminal plasma enzyme" see the whole document	9-12
Y	./.	1, 4-6, 9-12, 18
<p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
5 October 1990 (05.10.90)		24 October 1990 (24.10.90)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P,X	<p>FEBS LETTERS.</p> <p>Volume 252, No. 1,2, July 1989, AMSTERDAM NL pages 99 - 104; LATTION, A-L. et al.:  "The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme."  see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1-7,  9-12,  15-20</p>
P,X	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA.</p> <p>Volume 86, No. 20, October 1989, WASHINGTON US pages 7741 - 7745; EHLERS, M.R.W. et al.:  "Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme"  see the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1-12,  15-17</p>



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 90/00513

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 0 10px;"> <span>CIB 5</span> <span>C12N15/57 ; C12N9/64 ; G01N33/573 ; C12Q1/68</span> </div>		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; G01N ; C12Q ; C07K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>11</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 85, no. 24, décembre 1988, WASHINGTON US pages 9386 - 9390; SOUBRIER, F. et al.: "Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning." voir le document en entier	2-3, 15-16
Y	(cité dans la demande) --- <div style="text-align: center;">-/-</div>	1, 4-6, 9-12, 18
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>11</sup> Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; padding: 10px;">05 OCTOBRE 1990</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; padding: 10px;">24. 10. 90</div>
Administration chargée de la recherche internationale <div style="text-align: center; padding: 10px;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>		Signature du fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; padding: 10px;">ANDRES S.M. </div>

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. vol. 128, no. 1, 16 avril 1985, DULUTH, MINNESOTA US pages 457 - 463; LANZILLO, J.J. et al.: "Human testicular angiotensin-converting enzyme is a mixture of two molecular weight forms. Only one is similar to the seminal plasma enzyme" voir le document en entier	9-12
Y	---	1, 4-6, 9-12, 18
P,X	FEBS LETTERS. vol. 252, no. 1,2, juillet 1989, AMSTERDAM NL pages 99 - 104; LATTION, A-L. et al.: "The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme." voir le document en entier	1-7, 9-12, 15-20
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 86, no. 20, octobre 1989, WASHINGTON US pages 7741 - 7745; EHLERS, M.R.W. et al.: "Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme" voir le document en entier	1-12, 15-17
	---	